

Docket No.: 43888-092

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of

Tatsurou KAWAMURA

Serial No.:

Group Art Unit:

Filed: December 28, 2000

Examiner:

For: REAGENT AND METHOD FOR MEASURING A CONCENTRATION OF PROTEIN



**CLAIM OF PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENTS**

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicant hereby claims the priority of:

Japanese Patent Application No. 11-374752, filed December 28, 1999

and

Japanese Patent Application No. 2000-124904, filed April 25, 2000

cited in the Declaration of the present application. Certified copies are submitted herewith.

Respectfully submitted,

MCDERMOTT, WILL & EMERY

Thomas D. Fogarty For

Res. No.
43,369

Michael E. Fogarty
Registration No. 36,139

600 13th Street, N.W.
Washington, DC 20005-3096
(202) 756-8000 MEF:klm
Date: December 28, 2000
Facsimile: (202) 756-8087

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

43888-092
Dec 28, 2000
KAWAMURA

McDermott, Will & Emery

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

jc86201 S. PRO
09/749816
12/28/00

出 願 年 月 日
Date of Application: 1999年12月28日

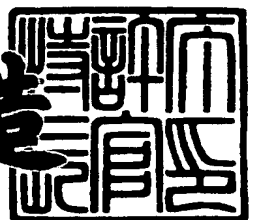
出 願 番 号
Application Number: 平成11年特許願第374752号

出 願 人
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

2000年11月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3094198

【書類名】 特許願

【整理番号】 2032610033

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/493

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 河村 達朗

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100072431

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 和郎

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066936

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9905716

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質濃度の計測用試薬及びこれを用いたタンパク質濃度の計測方法並びに尿検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 タンニン、タンニン酸および m-ガロイル没食子酸からなる群より選ばれた試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測し、それらの計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求めることを特徴とするタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 2】 前記透過光強度および散乱光強度の計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求める請求項 1 記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 3】 前記散乱光強度の計測値から、低濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定し、前記透過光強度の計測値から、高濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定する請求項 2 に記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 4】 前記透過光強度の計測値と前記散乱光強度の計測値とを照合することにより、被検溶液中の浮遊粒子、泡等による誤計測の有無を検知する請求項 2 または 3 に記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 5】 タンニン、タンニン酸および m-ガロイル没食子酸からなる群より選ばれた試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測する工程、および前記試薬混入前の前記被検溶液の旋光度を計測する工程を有し、前記透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方の計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求めるとともに、前記タンパク質濃度と前記旋光度とから前記タンパク質以外の旋光性物質の濃度を決定することを特徴とする溶液濃度の計測方法。

【請求項 6】 前記試薬がタンニンであり、試薬混入後の被検溶液のタンニンの濃度が $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にある請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 7】 前記試薬がタンニン酸であり、試薬混入後の被検溶液のタンニン酸の濃度が $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にある請求項 1 ～ 5 のいずれかに

記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 8】 前記試薬が m-ガロイル没食子酸であり、試薬混入後の被検溶液の m-ガロイル没食子酸の濃度が $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にある請求項 1～5 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 9】 被検溶液が尿である請求項 1～8 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測方法を用いる尿検査方法。

【請求項 10】 被検溶液が尿であり、タンパク質以外の旋光性物質がグルコースである請求項 5～8 のいずれかに記載の溶液濃度の計測方法を用いる尿検査方法。

【請求項 11】 前記被検溶液の透過光強度、散乱光強度または旋光度の計測に使用する波長が、 500 nm 以上である請求項 9 または 10 に記載の尿検査方法。

【請求項 12】 被検溶液に試薬を混入し、生じた濁度からタンパク質濃度を計測する方法に使用する試薬で、タンニンを含むことを特徴とするタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 13】 被検溶液に試薬を混入し、生じた濁度からタンパク質濃度を計測する方法に使用する試薬で、タンニン酸を含むことを特徴とするタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 14】 被検溶液に試薬を混入し、生じた濁度からタンパク質濃度を計測する方法に使用する試薬で、m-ガロイル没食子酸を含むことを特徴とするタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 15】 前記試薬が水に溶解された水溶液である請求項 12～14 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 16】 前記試薬が濃度 250 g/dl 以下のタンニン酸水溶液である請求項 13 に記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 17】 前記試薬が濃度 250 g/dl 以下の m-ガロイル没食子酸水溶液である請求項 14 に記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、被検溶液中に溶解している溶質の濃度、特にタンパク質濃度および旋光性物質の濃度を計測する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来のタンパク質濃度の計測方式としては、被検溶液にトリクロロ酢酸を混入してタンパク質を凝集させることにより溶液を混濁させ、その濁度からタンパク質濃度を求める方法がある。ただし、この方式は、25℃以上では、安定的に被検溶液を混濁させることが難しい。そのため、通常の家計における環境温度である25～40℃程度までにおいては、計測が不可能なことがある。

また、尿検査装置としては、試薬を含浸した試験紙などに尿を浸し、その呈色反応を分光器などによって観測し、尿の成分を検査するものがある。ここで使用される試験紙は、グルコース、タンパク質等の個々の検査項目に応じてそれぞれ用意されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の問題を解決して、通常の家計における環境温度である0～40℃程度の範囲で信頼性が高く、維持管理が容易なタンパク質濃度の計測方法およびそれに使用する試薬を提供することを目的とする。

また、本発明は、簡便で高精度な尿検査を可能にする方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するため本発明のタンパク質濃度の計測方法は、タンパク質のみの光学特性を変化させる試薬として、タンニン、タンニン酸、およびm-ガロイル没食子酸からなる群より選ばれたものを使用することを特徴とする。

【0005】

本発明のタンパク質濃度の計測方法は、前記の試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測し、それらの計測値にも

とづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求める。

ここにおいて、前記散乱光強度の計測値から低濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定し、前記透過光強度の計測値から高濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定することが好ましい。

前記透過光強度の計測値と前記散乱光強度の計測値とを照合することにより、被検溶液中の浮遊粒子、泡等による誤計測の有無を検知することができる。

【0006】

本発明は、前記試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測する工程、および前記試薬混入前の前記被検溶液の旋光度を計測する工程を有し、前記透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方の計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求めるとともに、前記タンパク質濃度と前記旋光度とから前記タンパク質以外の旋光性物質の濃度を決定する溶液濃度の計測方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明のタンパク質濃度の計測に用いる試薬タンニンとは、広く植物界に分布する多数のフェノール性ヒドロキシル基をもつ複雑な芳香族化合物の総称（東京化学同人発行の化学辞典）であり、分子量が600-2000ぐらい（共立出版発行の化学大辞典）である。

タンニン酸は、式 $C_{76}H_{52}O_{46}$ で表され、CAS登録番号が1401-55-4の物質である。また、m-ガロイル没食子酸は式 $C_{14}H_{10}O_9$ で表され、CAS登録番号が536-08-3の物質である。

【0008】

これらの試薬は、被検溶液中のタンパク質と反応して濁りを生じ、そのタンパク質濃度に対応した度合いの濁度を引き起こす。このような試薬を被検溶液に混入させることにより、被検溶液のタンパク質濃度を計測することができる。例えば、尿を被検溶液とした場合には、試薬を混入してタンパク質成分を凝集させることにより光学特性を変化させ、試薬混入前後の散乱光強度の差（試薬混入後の散乱光強度-試薬混入前の散乱光強度）および／または試薬混入前後の透過光強

度の比（試薬混入後の透過光強度／試薬混入前の透過光強度）から、被検溶液中のタンパク質濃度を求めることができる。

【 0 0 0 9 】

本発明によるタンパク質濃度の計測方法により、尿を始めとする髄液、血清、血漿、唾液などの体液や、乳製品、酒、食酢などの食品、培養液などの産業用液、および人工透析液やその廃液などの被検溶液中に含まれるタンパク質濃度を求めることができる。

また、被検溶液の旋光度を計測した後、前記試薬を混入してタンパク質濃度を計測することにより、タンパク質の濃度とグルコースなどのタンパク質以外の旋光性物質を同時に決定することができる。

このように本発明は、尿を被検溶液として尿タンパク濃度や尿糖値を測定して検査する場合に特に有用であり、検査の信頼性や精度を向上させ、検査工程を大幅に簡略化することができる。

【 0 0 1 0 】

《実施の形態 1》

濃度 = 1 g / d l のタンニン水溶液を被検溶液に容量比 1 : 1 の比率で混入してタンパク質を凝集させることにより被検溶液を混濁させ、その散乱光強度を計測し、この計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求める例について、図 1 を用いて詳細に説明する。

図 1 は、本発明のタンパク質濃度の計測方法に使用する装置の概略構成を示す側面図であり、図 2 はその光学系を示す平面図である。これらの図において、1 は半導体レーザモジュールからなる光源を示し、波長 7 8 0 n m、強度 3 . 0 m W、ビーム直径 2 . 0 m m の略平行光 2 を投射する。サンプルセル 3 は、ガラス製で、上部に開放された開口部を有し、底面が 1 0 × 1 0 m m、高さが 5 0 m m の直方体状容器であり、側面は透明な光学窓である。このサンプルセル 3 は、その内部に收容された被検溶液に略平行光 2 を照射することができ、また、透過光および散乱光 7 を外部に取り出すことができる。被検溶液を透過した光を検知する光センサー 4 および被検溶液中を光が伝搬する際に発生した散乱光 7 を検知する光センサー 5 により、それぞれ透過光および散乱光が検知される。コンピュー

ター 6 は、光源 1 を制御するとともに、光センサー 4 および 5 の出力信号を解析する。

【 0 0 1 1 】

上記の計測装置を用いて、タンパク質水溶液を被検溶液としてタンパク質濃度を計測する手順を以下に説明する。なお、以下の操作は気温約 4 0℃の部屋で実施され、被検溶液、試薬及び計測装置とも約 4 0℃の状態にあった。

まず、被検溶液 1 m l をビーカー等に入れ、濃度 1 g / d l のタンニン水溶液 1 m l をこのビーカーに入れ、攪拌する。次に、この混合溶液をサンプルセル 3 へ導入する。コンピューター 6 が光源 1 を動作させ、同時に光センサー 4 および 5 の出力信号の計測する。

被検溶液にタンニン水溶液試薬が混入されると、タンパク質成分が凝集して被検溶液が濁り、透過光強度が低下し、散乱光強度が増加する。この時の光センサー 4 および 5 のそれぞれの出力信号の計測値を解析することにより、タンパク質濃度を求める。

【 0 0 1 2 】

あらかじめ濃度が 0、2、5、1 5、3 0、6 0、1 0 0 m g / d l のタンパク質（血清アルブミン）水溶液を作成した。これら被検溶液を用い、上記の方法で散乱光強度および透過光強度、即ち、光センサー 5 および 4 の出力信号を計測した。それらの結果をそれぞれ図 3 および図 4 に示す。図 3 においては、タンパク質濃度を横軸に、散乱光強度を縦軸（光センサー 5 の出力信号）に示した。図 4 においては、タンパク質濃度を横軸に、透過光強度を縦軸（光センサー 4 の出力信号）に示した。なお、これらすべての被検溶液は、タンニン水溶液試薬と混入される前は、水と同程度に透明であり、透過光強度と散乱光強度は水と同じであった。また、濃度 = 0 即ち水の場合、タンニン水溶液試薬の混入前後における透過光強度と散乱光強度の変化は観測できず、実質的に透明であった。

【 0 0 1 3 】

図 3 において、各実測値をスムーズに結んで実線で示し、散乱光強度が濃度に対して直線的に変化しているタンパク質濃度 0 ~ 1 5 m g / d l の領域の実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線と点線から明らかなように、

タンパク質濃度が約 15 mg/dl までは実線と点線が重なり、散乱光強度はタンパク質濃度に比例している。しかし、これより高濃度になるにつれて、次第に比例関係よりも低い実測値を示している。これは、タンパク質濃度が高くなり、光が散乱される確率が高くなると、散乱光が発生した地点からサンプルセルの外まで伝搬する際に、再び散乱される確率も高くなり、光センサー 5 に散乱光が到達する確率が低下するからである。従って、散乱光強度の変化から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる低濃度域（約 15 mg/dl 以下）において、より高精度な濃度を求めることができる。

図 4 において、横軸はタンパク質濃度を、縦軸（対数表示）は透過光強度を示す。各実測値をスムーズに結んで実線で示し、濃度に対して透過光強度の対数が直線的に変化しているタンパク質濃度 15～100 mg/dl での実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。図 4 で示したように、タンパク質濃度が 2 及び 5 mg/dl のような低濃度の場合には、この点線から外れる場合がある。これは、混濁していない全出力信号（= 1.0 V）に比べて変化割合が小さすぎるため、各種ノイズの影響を受けやすいからである。このことから、透過光強度の計測値からタンパク質濃度を算出する場合において、各種ノイズの影響を避けるためには、被検溶液が高濃度域（約 15 mg/dl 以上）にあることがより望ましいことが分かる。

従って、これらから得られた図 3 及び図 4 を、それぞれの低濃度域及び高濃度域における標準的な検量線として使用することが望ましい。図 3 及び図 4 は、被検溶液、試薬、及び雰囲気温度が 40℃ の例を示したが、0～50℃ の範囲においても計測可能であった。従って、試薬としてトリクロロ酢酸を使用した時とは異なり、25℃ 以上でも計測でき、家庭でありうる環境温度でも使用可能である。

【0014】

以上のようにして、被検溶液にタンニン水溶液試薬を混入して、透過光強度あるいは散乱光強度を計測することにより、被検溶液のタンパク質濃度を求めることができる。

さらに、上記双方の強度を計測することにより、低濃度域の被検溶液について

は、散乱光強度の計測値から溶液濃度を算出し、高濃度域の被検溶液については、透過光強度の計測値から溶液濃度を算出することにより、実質的に高精度に測定できる被検溶液の濃度範囲、即ちダイナミックレンジを拡大できる。これにより、従来必要であった高濃度被検溶液の希釈等の工程が不要になり、計測および検査の高精度化、効率化、及び省力化に有効な実用的効果を高めることができる。

なお、本実施の形態では、タンニン水溶液試薬の濃度が 1 g/dl の例を示した。この場合、被検溶液への混入比率が $1:1$ のため、混入後の濃度は 0.5 g/dl となるが、これ以外の混入後濃度でも、 $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にあれば、各混入後タンニン濃度に応じて検量線を作成することにより、タンパク質濃度を計測できる。上記の範囲よりも、タンニンが低濃度の場合は、タンパク質が凝集しないこともあり、安定的な計測が難しい。また、上記の範囲よりも、タンニンが高濃度の場合は、凝集したタンパク質が急激に沈殿して、混濁が不均一になり、略平行光 2 の付近では濃度に応じて混濁がしないこともあり、安定的な計測が難しい。従って、上記濃度範囲で計測することが実用上望ましい。

【0015】

《実施の形態 2》

本実施の形態は、被検溶液にタンニン酸水溶液を混入しタンパク質を凝集させることにより被検溶液を混濁させ、混入前後の混濁度の変化からタンパク質濃度を計測する方式である。具体的には、濃度 $= 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($\equiv 0.05 \text{ g/dl}$) のタンニン酸水溶液試薬を、被検溶液の容量 9 に対して 1 の比率で混入して、試薬を混入する前後の透過光強度および／または散乱光強度を計測し、それらの計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求める例である。この場合、混入後のタンニン酸の濃度は $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{ g/dl}$) である。なお、実施の形態 1 と同様、以下の操作は気温約 40°C の部屋で実施され、被検溶液、試薬及び計測装置とも約 40°C の状態にあった。

【0016】

図 5 は、本発明のタンパク質濃度の計測方法に使用する装置の概略構成を示す側面図であり、図 6 はその光学系の平面図である。これらの図において、1～7

は図 1 及び図 2 の 1 ～ 7 と全く同じ構成要素を示し、それらの配置も同様である。サンプルセル 3 の底部には、試薬の混入口 8 が設けてあり、この混入口 8 を通じて、ピペッタ 9 により、試薬の所定容量をサンプルセル 3 中の被検溶液に混入する。コンピューター 6 は、光源 1 およびピペッタ 9 を制御するとともに、光センサー 4 および 5 の出力信号を解析する。

【 0 0 1 7 】

上記の計測装置を用いて、尿を被検溶液として尿タンパク濃度を検査する場合の動作は次の通りである。

まず、被検溶液 1. 8 m l をサンプルセル 3 へ導入する。コンピューター 6 が光源 1 を動作させ、同時に光センサー 4 および 5 の出力信号のモニターを開始する。次に、コンピューター 6 がピペッタ 9 を制御して、混入口 8 を通じてタンニン酸水溶液試薬をサンプルセル 3 へ 0. 2 m l 混入する。被検溶液にタンニン酸試薬が混入されると、タンパク質成分が凝集して被検溶液が濁り、透過光強度が低下し、散乱光強度が増加する。この試薬の混入の前後の光センサー 4 および 5 のそれぞれの出力信号の計測値を解析することにより、タンパク質濃度を求める。

【 0 0 1 8 】

タンパク質濃度が 5 m g / d l の被検溶液を用い、上記の方法で測定した散乱光強度及び透過光強度、即ち、光センサー 5 および 4 の出力信号をそれぞれ図 7 および図 8 に示す。図 7 および 8 において、横軸は試薬混入後の経過時間（秒）、縦軸はセンサーで検知された光強度をそれぞれ表し、混入前 6 0 秒から混入後 3 0 0 秒までの散乱光あるいは透過光の強度変化を示している。

【 0 0 1 9 】

このような、散乱光強度の変化および透過光強度の比とタンパク質濃度との相関関係をそれぞれ図 9 および図 1 0 に示す。図 9 においては、試薬混入前の散乱光強度と混入後 3 0 0 秒経過時の散乱光強度との差（試薬混入後の散乱光強度－試薬混入前の散乱光強度）を縦軸に示した。図 1 0 においては、試薬混入前の透過光強度と混入後 3 0 0 秒経過時の透過光強度との比（試薬混入後の透過光強度／試薬混入前の透過光強度）を縦軸に示した。なお、図 9 及び 1 0 には前記タン

パク質濃度 = 5 mg / d l の被検溶液以外に、タンパク質濃度が 0、15、30、60、100 mg / d l の尿を被検溶液としてそれぞれ追加して計測した結果を示した。これらの場合、計測した被検溶液はすべて、試薬の混入前には光学的に水と同程度に透明であり、透過光強度と散乱光強度は水と同じであった。

【0020】

図9において、各実測値をスムーズに結んで実線で示し、散乱光強度の変化量（試薬混入前後の散乱光強度の差）に対して直線的に変化しているタンパク質濃度 0 ~ 30 mg / d l の領域の実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線を検量線とすることにより、タンパク質濃度を計測することができる。また、この実線と点線から明らかなように、タンパク質濃度が約 30 mg / d l までは実線と点線が重なり、散乱光強度の変化量はタンパク質濃度に比例している。しかし、これより高濃度になるにつれて、次第に比例関係よりも低い実測値を示している。これは、タンパク質濃度が高くなり、光が散乱される確率が高くなると、散乱光が発生した地点からサンプルセルの外まで伝搬する際に、再び散乱される確率も高くなり、光センサー 5 に散乱光が到達する確率が低下するからである。従って、散乱光強度の変化から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる低濃度域（約 30 mg / d l 以下）において、より高精度な濃度を求めることができる。

図10において、横軸はタンパク質濃度を、縦軸（対数表示）は試薬混入前後の透過光強度の比を示す。各実測値をスムーズに結んで実線で示し、直線的に変化しているタンパク質濃度 60 ~ 100 mg / d l での実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線を検量線とすることによりタンパク質濃度を計測することができる。また、図10で示したように、タンパク質濃度 30 mg / d l 以下の低濃度領域の場合には、この点線から外れる場合がある。これは、全出力信号に比べて変化割合が小さすぎるため、各種ノイズの影響を受けやすいからである。このことから、透過光強度の計測値からタンパク質濃度を算出する場合において、各種ノイズの影響を避けるためには、被検溶液が高濃度域（約 30 mg / d l 以上）にあることがより望ましいことが分かる。

【0021】

以上のようにして、試薬混入前後の透過光強度あるいは試薬混入前後の散乱光強度を計測することにより、被検溶液のタンパク質濃度を求めることができる。さらに、上記双方の強度を計測することにより、低濃度域の被検溶液については、散乱光強度の計測値から溶液濃度を算出し、高濃度域の被検溶液については、透過光強度の計測値から溶液濃度を算出することにより、実質的に高精度に測定できる被検溶液の濃度範囲、即ちダイナミックレンジを拡大できる。

【 0 0 2 2 】

本実施の形態によれば、各種塩などが析出して混濁した尿を被検溶液としてタンパク質濃度を求めることができる。これについて以下に説明する。

まず、被検溶液としてタンパク質濃度 30 mg/dl の混濁した尿をサンプルセル 3 へ導入した。この時の、光センサー 5 の出力信号（散乱光強度）は 0.05 V 程度である。図 7 から、混濁が無い被検溶液の場合は、混入前の光センサー 5 の出力信号は 0.0 V であることから、この出力信号の差が本実施の形態の被検溶液本来の混濁程度を示しているといえる。この値は図 9 の実線を検量線として、タンパク質濃度に換算すると $10 \sim 12 \text{ mg/dl}$ に相当する。ここで、試薬を混入し、光センサー 4 および／または光センサー 5 の出力信号の変化を観測した。試薬を混入後 300 秒経過した時点の光センサー 5 の出力信号は、 0.19 V で、 0 秒時点の出力信号との差は 0.14 V となる。図 9 を検量線として、この出力信号の差（ 0.14 V ）をタンパク質濃度に換算すると 30 mg/dl となり、この濃度があらかじめ計測された既知濃度に一致する。このことから、混濁が無い被検溶液から求めた図 9 の検量線を用いて、試薬混入前後の光センサー 5 の出力信号の差から混濁被検溶液のタンパク質濃度を正確に求められることが確認された。

【 0 0 2 3 】

以上のように、試薬の混入前後の散乱光強度の差より、溶液濃度を算出することにより、混濁等の影響が消去された正確な溶液濃度を求めることが可能になる。

一方、試薬の混入前の光センサー 4 の出力信号（透過光強度）は 0.55 V である。混濁が無い透明な被検溶液の場合は、図 8 の様に混入前の光センサー 4 の

出力信号は 0.6 V であることから、この相違は被検溶液の混濁によるものといえる。試薬混入後 300 秒経過した時点での出力信号が 0.45 V であり、その比は 0.82 となる。図 10 を検量線として、この出力信号の比 (0.82) をタンパク質濃度に換算すると 30 mg/dl となり、この濃度はあらかじめ計測された既知濃度に一致する。このことから、試薬混入前後の光センサー 4 の出力信号の比を求め、混濁が無い被検溶液から求めた図 10 を検量線として、タンパク質濃度に換算することにより、混濁した被検溶液の正確なタンパク質濃度を求められることが確認された。

【0024】

なお、本実施の形態では、試薬混入直前と 300 秒経過時点の透過光強度および散乱光強度の計測値から溶液濃度を求めたが、この時間差は計測装置、被検溶液やタンニン酸試薬の濃度などの特性に応じて適宜に設定すればよい。

また、図 7～10 は被検溶液、試薬、及び雰囲気温度が 40°C の例を示したが、 $0\sim 50^\circ\text{C}$ の範囲においても計測可能であった。従って、試薬としてトリクロロ酢酸を使用した時とは異なり、 25°C 以上でも計測でき、家庭でありうる環境温度でも使用可能である。

本実施の形態では、タンニン酸水溶液試薬の濃度が $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($\equiv 0.05 \text{ g/dl}$) で、被検溶液の容量 0.9 に対して 0.1 の比率で混入することで、混入後のタンニン酸の濃度が $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{ g/dl}$) の例を示した。これ以外の混入後濃度でも、 $3 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-2} \text{ M}$ ($5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$) の範囲にあれば、各混入後タンニン酸濃度に応じて検量線を作成することによりタンパク質濃度を計測できる。上記の範囲よりも、タンニン酸が低濃度の場合は、タンパク質が凝集しないこともあり、安定的な計測が難しい。また、上記の範囲よりも、タンニン酸が高濃度の場合は、凝集したタンパク質が急激に沈殿して、混濁が不均一になり略平行光 2 付近では濃度に応じて混濁がしないこともあり、安定的な計測が難しい。従って、上記濃度範囲で計測することが実用上望ましい。

【0025】

本実施の形態では、被検溶液と試薬の混入比率が 9 : 1 の例を示したが、混入

後のタンニン酸の濃度が前記の例と同じく $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{g/dl}$) であっても、混入比率が異なると、検量線も異なるため、この混入比率に応じた検量線を作成する必要がある。この際、被検溶液と試薬の混入比率が大きく、例えば 1 : 1 になると、同じタンパク質濃度の被検溶液に対する混濁は小さくなる。従って、単にタンパク質濃度に対する感度を向上させるには、混入比率を小さくすると有利になるので、混入後のタンニン酸の濃度を一定とした場合、タンニン酸の濃度が高いタンニン酸水溶液試薬を利用する方が有利である。ここで、試薬が使用される家庭でありうる環境温度である $0 \sim 40^\circ\text{C}$ においても、析出や変質がないタンニン酸濃度は、 1.5M ($\equiv 250 \text{g/dl}$) 以下であることが判明したので、タンニン酸水溶液試薬の濃度をこの濃度以下に設定することが実用上有利である。

【 0 0 2 6 】

《実施の形態 3》

図 5 および図 6 に示した計測装置を用い、実施の形態 2 と同様の方法により、光センサー 4 および光センサー 5 の双方の出力信号を計測し、両計測値を照合することにより、浮遊粒子、泡等による計測妨害の有無を検知する例を説明する。

被検溶液中に、浮遊粒子や泡が存在し、これらが略平行光 2 の光路に侵入すると、これらに略平行光 2 が強く散乱されて透過光強度および／または散乱光強度の正確な計測が妨害される。この場合、透過光強度は大きく減少する。一方、散乱光強度は、光センサー 5 の視野角、および浮遊粒子や泡が光路中に存在する位置などによって、大きく減少する場合と増加する場合がある。

これら浮遊粒子や泡による妨害が無い場合は、図 9 および図 10 で示したように、散乱光強度の計測値と透過光強度の計測値には、一定の関係が存在する。例えば、被検溶液のタンパク質濃度が 30mg/dl のとき、タンニン酸水溶液試薬混入前後の散乱光強度の差は 0.14V で、試薬混入前後の透過光強度の比は 0.82 である。ところが、上記のような妨害が存在すると、このような関係から外れた値が計測されることになる。従って、タンニン酸水溶液試薬混入前後の光センサー 4 の計測値から図 10 の検量線にもとづいて求めたタンパク質濃度と、光センサー 5 の出力信号の計測値から図 9 の検量線にもとづいて求めたタンパ

ク質濃度との、双方の濃度値が一致するか否かを照合することにより、前記の妨害の有無を検知することができる。

【0027】

以上のように本実施の形態によれば、タンニン酸水溶液試薬混入前後の透過光強度および試薬混入前後の散乱光強度の双方を測定し、これらを照合することにより、浮遊粒子、泡等による妨害を検知して誤計測を防止できる。これにより、計測の信頼性を向上させることができ、その実用的効果は極めて大きく、計測および検査の高信頼化および省力化が可能になる。

【0028】

《実施の形態4》

試薬混入前に被検溶液の旋光度を計測するとともに、被検溶液にm-ガロイル没食子酸水溶液を混入してタンパク質を凝集させることにより、被検溶液を混濁させ、試薬混入前後の混濁度の変化からタンパク質濃度を計測し、これらの計測値から、タンパク質濃度とタンパク質以外の旋光性物質の濃度を確定する方法の例を説明する。

具体的には、まず被検溶液の旋光度を計測した後に、濃度 $=7.8 \times 10^{-1} \text{M}$ ($\equiv 250 \text{ g/dl}$) のm-ガロイル没食子酸水溶液試薬を、被検溶液の容量49に対して1の比率で混入して、試薬を混入する前後の透過光強度を計測する。そして、この計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求め、この濃度と旋光度の計測結果より、タンパク質以外の旋光性物質の濃度を確定する。この場合、試薬混入後のm-ガロイル没食子酸の濃度は $1.6 \times 10^{-1} \text{M}$ ($\equiv 5 \text{ g/dl}$) である。これについて、以下に詳細に説明する。

【0029】

図11は本実施の形態に使用する計測装置の構成を模式的に示す図である。半導体レーザモジュールの光源11から、波長670nm、強度3.0mW、ビーム直径2.0mmの略平行光12を投射する。偏光子17は、紙面に平行な偏光成分の光のみを透過する。被検溶液を収容するサンプルセル13は、被検溶液に略平行光12の伝搬方向に磁場を印加できるようにソレノイドコイル14を巻いた構造になっており、実質光路長は50mmで、定格容量は5mlである。これ

は、被検溶液の光ファラデー効果を用いて、ソレノイドコイル 1 4 に流す電流を変調しながら制御することによって、略平行光 1 2 の偏光方向を変調しながら制御するものである。このように、被検溶液自身のファラデー効果によって、旋光度を計測する方式の基本原理は、特開平 9 - 1 4 5 6 0 5 号公報に記載されている。

サンプルセル 1 3 は、試薬の混入口 1 5、および空気の出入りする通気口 1 6 を有する。検光子 1 8 は、紙面に垂直な偏光成分の光のみを透過するように配置されている。検光子 1 8 を透過した略平行光 1 2 は光センサー 1 9 で検出される。信号発生器 2 1 は、ソレノイドコイル 1 4 に流す電流を変調する変調信号をコイルドライバー 2 0 に供給する。コイルドライバー 2 0 は、ソレノイドコイル 1 4 に流す電流を制御する。ロックインアンプ 2 2 は、ソレノイドコイル 1 4 の変調信号を参照信号として光センサー 1 9 の出力信号を位相敏感検波する。被検溶液の旋光度を計測する際は、コンピューター 2 3 により、ロックインアンプ 2 2 の出力信号がゼロになるように、コイルドライバー 2 0 に制御電流信号を供給する。

【 0 0 3 0 】

本実施の形態においては、ソレノイドコイル 1 4 に、振幅 0. 0 0 1 アンペア、周波数 1. 3 k H z の変調電流を流している。これらによって、ロックインアンプ 2 2 の出力信号がゼロになる制御電流信号を見だし、旋光度を算出する。ここでは、被検溶液中の旋光性物質であるタンパク質やグルコースによって生じた旋光度と、磁場印加による被検溶液の溶媒水のファラデー効果による偏光方向の回転角が一致する磁場を与える制御電流信号によって前記旋光度を求める方法を採用した。

ピペッタ 2 4 は、チューブ 2 5 を通じて、混入口 1 5 より、サンプルセル 1 3 中の被検溶液に m - ガロイル没食子酸水溶液試薬を 0. 1 m l 混入する。コンピューター 2 3 は、光源 1 1 およびピペッタ 2 4 を制御し、光センサー 1 9 の出力信号を解析する。

【 0 0 3 1 】

上記の装置を用いて、尿を被検溶液としてグルコース濃度（尿糖値）および尿

タンパク濃度を検査する場合の動作は次の通りである。

まず、被検溶液をサンプルセル 13 へ導入する。コンピューター 23 で光源 11 とコイルドライバ 20 を動作させ、被検溶液の旋光度を計測する。

次に、コンピューター 23 でコイルドライバ 20 の動作を停止させ、同時に光センサー 19 の出力信号のモニターを開始する。次に、コンピューター 23 でピペッタ 24 を制御して、混入口 15 より m-ガロイル没食子酸水溶液試薬をサンプルセル 13 中の被検溶液へ混入する。この混入の前後の光センサー 19 の出力信号の変化を、透過光強度の変化と見なして、解析された試薬混入前後の透過光強度の比から、実施の形態 2 と同様な方法により、タンパク質濃度が、0、2、5、15、60 mg/dl の尿を被検溶液として図 10 に相当する検量線を作成した。この検量線を図 12 に示す。

【0032】

上記の計測の例として、尿糖値が 100 mg/dl、尿タンパク濃度が 15 mg/dl の尿を被検溶液として用いた場合の旋光度の計測値は、 0.017° であった。この波長 (670 nm) におけるグルコースの比旋光度は $40^\circ \text{ deg/cm} \cdot \text{dl/kg}$ であるので、計測された旋光度がすべてグルコースにより発現されていると仮定すると、グルコース濃度即ち尿糖値は 85 mg/dl と計算される。一方、透過光強度の比は 0.41 であったので、図 12 から求めたタンパク質濃度は 15 mg/dl となる。タンパク質の比旋光度が $-40^\circ \text{ deg/cm} \cdot \text{dl/kg}$ であることから、タンパク質により発現された旋光度は -0.003° と算出される。従って、グルコースにより発現された真の旋光度は前記の 0.017° から -0.003° を差し引いた 0.02° となり、この旋光度に対応するグルコース濃度は 100 mg/dl と算出される。

【0033】

これらのことから、本実施の形態により、m-ガロイル没食子酸水溶液試薬混入前の被検溶液の旋光度と試薬混入前後の透過光強度の比を計測することにより、尿糖値と尿タンパク濃度を同時に正確に確定できることが確認された。

以上のように本実施の形態によれば、タンパク質濃度と、タンパク質以外の旋光性物質としてグルコースの濃度を同時に測定することができるので、尿を被検

溶液とした場合に、特にその実用性が高い。その理由を以下に述べる。

尿タンパク濃度が正常な場合は、尿中の旋光性物質としては、グルコースが支配的なので、尿の旋光度を計測することによりおよその尿糖値を検査できる。しかし、尿タンパク濃度を旋光度計測以外の計測方式で求めることにより、より正確な尿検査ができる。なぜなら、グルコースとともに、タンパク質も旋光性物質であるため、グルコースより発現された旋光度と、タンパク質により発現された旋光度を加算した旋光度が尿の旋光度として計測されるからである。そこで、本実施の形態のように、旋光度の計測とともに、上記のように試薬混入前後の光学的物性変化からタンパク質濃度を求め、この濃度により、旋光度の計測結果を補正することにより、尿糖値と尿タンパク濃度を正確に確定することができる。

ちなみに、旋光度の計測前に試薬を混入すると、タンパク質成分が凝集するので、被検溶液中を光が透過しなかったり、タンパク質が変性して旋光度を変化させたりすることがあり、尿糖値と尿タンパク濃度を正確に測定できない。

【0034】

本実施の形態では、波長 = 670 nm の光を用いて、旋光度と透過光強度を計測した例を示したが、一般的に物質の比旋光度は、物質固有の吸収（グルコースの場合 180 nm 付近）が始まる波長までは、波長が短いほど大きくなる。更に、タンパク質の凝集による濁度は、短い波長に対するほど大きくなる。従って、短い波長の光を用いて、旋光度、透過光強度、および散乱光強度を計測した方が、感度的には有利になる。ただし、被検溶液が尿の場合、尿中に含まれるウロクローム等の色素により、波長が 500 nm 以下の光は吸収される。このため、波長が 500 nm より短い光で計測すると、かえって精度が悪化することがある。従って、波長が 500 nm 以上の光を用いて計測するのが実用的である。

本実施の形態では、被検溶液と試薬の混入比率が 49 : 1 の例を示したが、混入後の m-ガロイル没食子酸の濃度が例と同じく $1.6 \times 10^{-1} \text{M}$ ($\approx 5 \text{ g/dl}$) であっても、混入比率が異なると、検量線も異なるため、この混入比率に応じた検量線を作成する必要がある。この際、被検溶液と試薬の混入比率が大きく、例えば 1 : 1 になると、同じタンパク質濃度の被検溶液に対する混濁は小さくなる。従って、単にタンパク質濃度に対する感度を向上させるには、混入比率を

小さくすると有利になるので、混入後のm-ガロイル没食子酸の濃度を一定とした場合、本実施の形態のようにm-ガロイル没食子酸の濃度が高い試薬を利用する方が有利である。ここで、試薬が使用される家庭でありうる環境温度である0～40℃においても、析出や変質がないm-ガロイル没食子酸濃度は、7.8M(≒250g/dl)以下であることが判明したので、m-ガロイル没食子酸水溶液試薬の濃度をこの濃度以下に設定した。

【0035】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、通常の家計における環境温度としてあり得る0～40℃程度までにおいても、タンパク質濃度の計測が可能になる。また、計測可能な被検溶液の濃度範囲を拡大することができ、同時に泡や浮遊粒子による計測の妨害も検知することができる。その結果、被検溶液中のタンパク質濃度を高精度で求めることができ、しかも、高信頼性で実用性が高い省力化された溶液濃度の測定、とりわけ尿中のタンパク質濃度の測定が可能になる。

また、被検溶液中のタンパク質とタンパク質以外の旋光性物質の双方の濃度を求めることもでき、特に被検溶液が尿の場合、尿タンパク濃度と尿糖値を同時に正確に測定できるので、尿検査工程を大幅に簡略化でき、その実用的効果は極めて大きい。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施の形態に用いた計測装置の概略構成を示す側面図である。

【図2】

同装置の平面図である。

【図3】

被検溶液のタンパク質濃度と散乱光強度との関係を示す図である。

【図4】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度との関係を示す図である。

【図5】

本発明の他の実施の形態に用いた計測装置の概略構成を示す側面図である。

【図 6】

同装置の平面図である。

【図 7】

被検溶液の散乱光強度の変化を示す図である。

【図 8】

被検溶液の透過光強度の変化を示す図である。

【図 9】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の変化量との関係を示す図である。

【図 1 0】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の比との関係を示す図である。

【図 1 1】

本発明のさらに他の実施の形態に用いた計測装置の概略構成を示す側面図である。

【図 1 2】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の比との関係を示す図である。

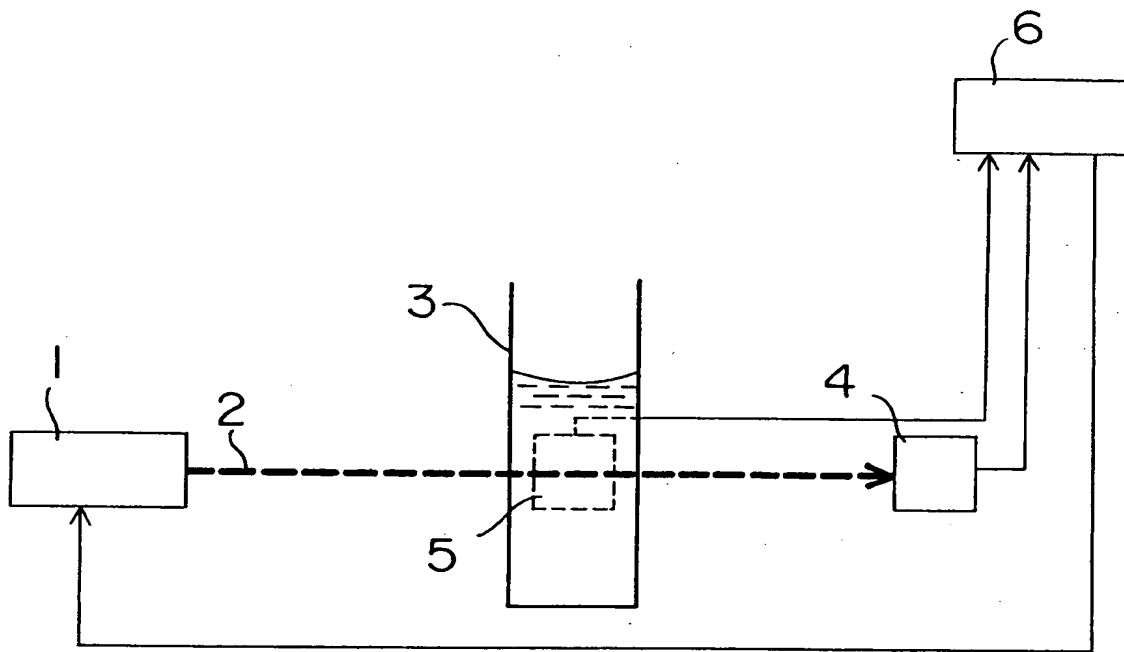
【符号の説明】

- 1、1 1 光源
- 2、1 2 略平行光
- 3、1 3 サンプルセル
- 4、1 9 透過光を検知する光センサー
- 5 散乱光を検知する光センサー
- 6、2 3 コンピューター
- 7 散乱光
- 8、1 5 混入口
- 9、2 4 ピペッタ
- 1 7 偏光子
- 1 4 ソレノイドコイル
- 1 6 通気口
- 1 8 検光子

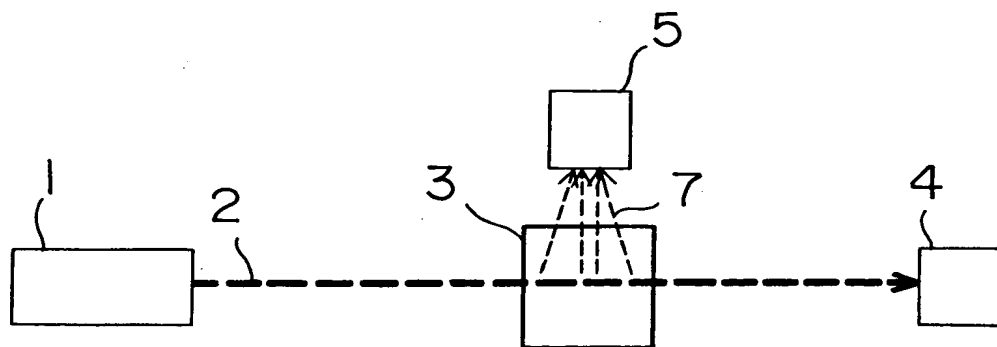
- 2 0 コイルドライバー
- 2 1 信号発生器
- 2 2 ロックインアンプ
- 2 5 チューブ

【書類名】 図面

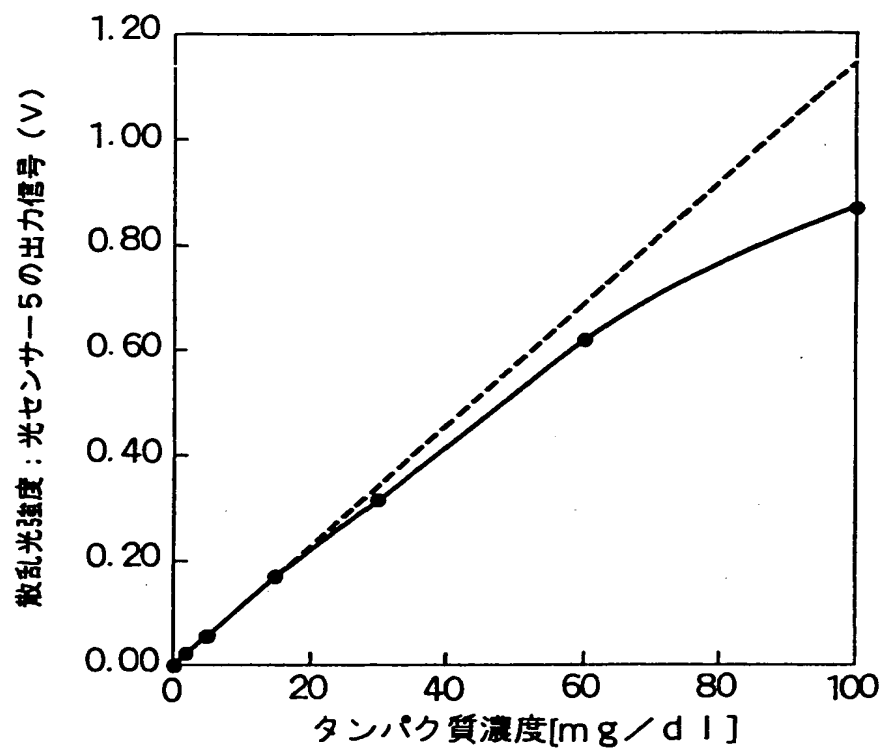
【図 1】



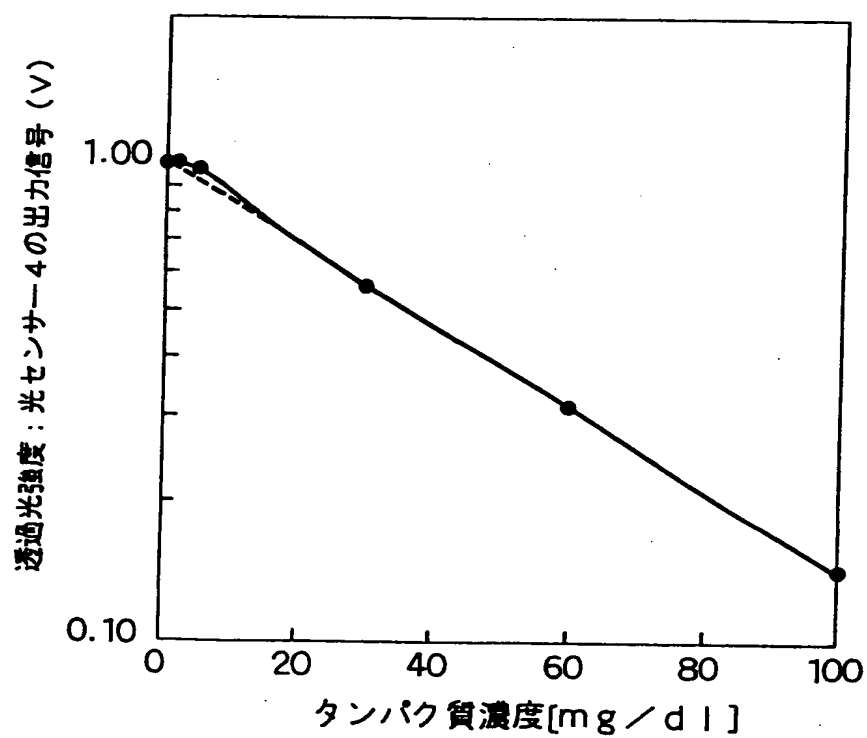
【図 2】



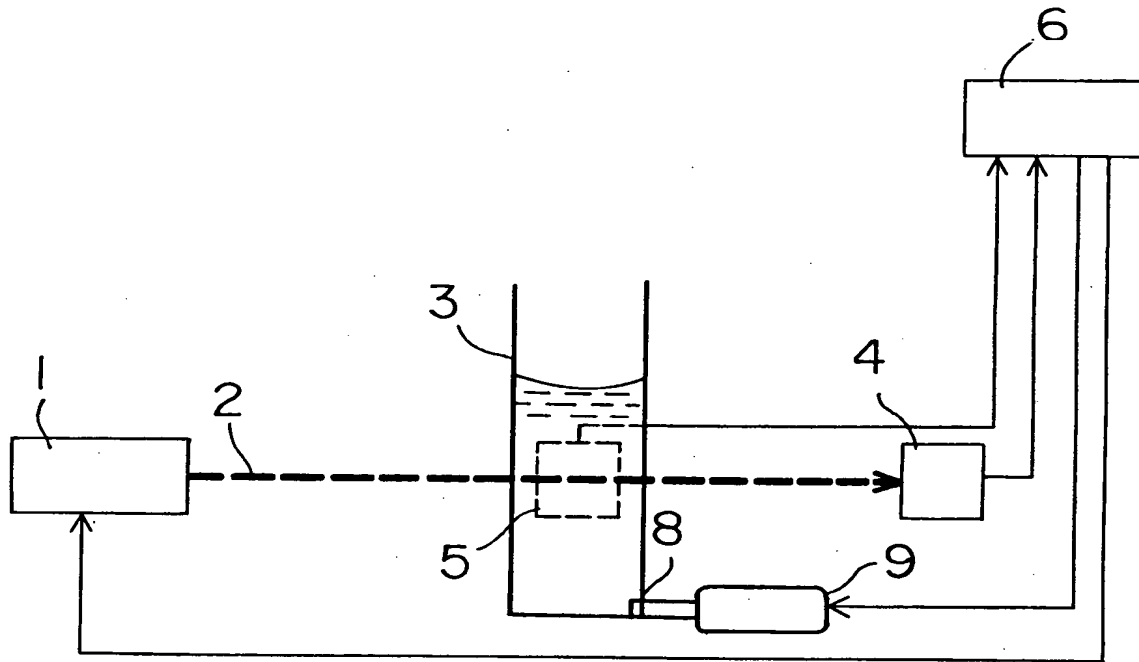
【図 3】



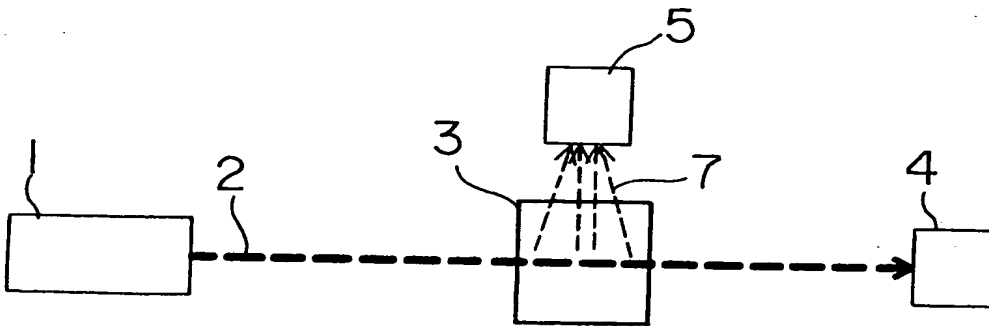
【図 4】



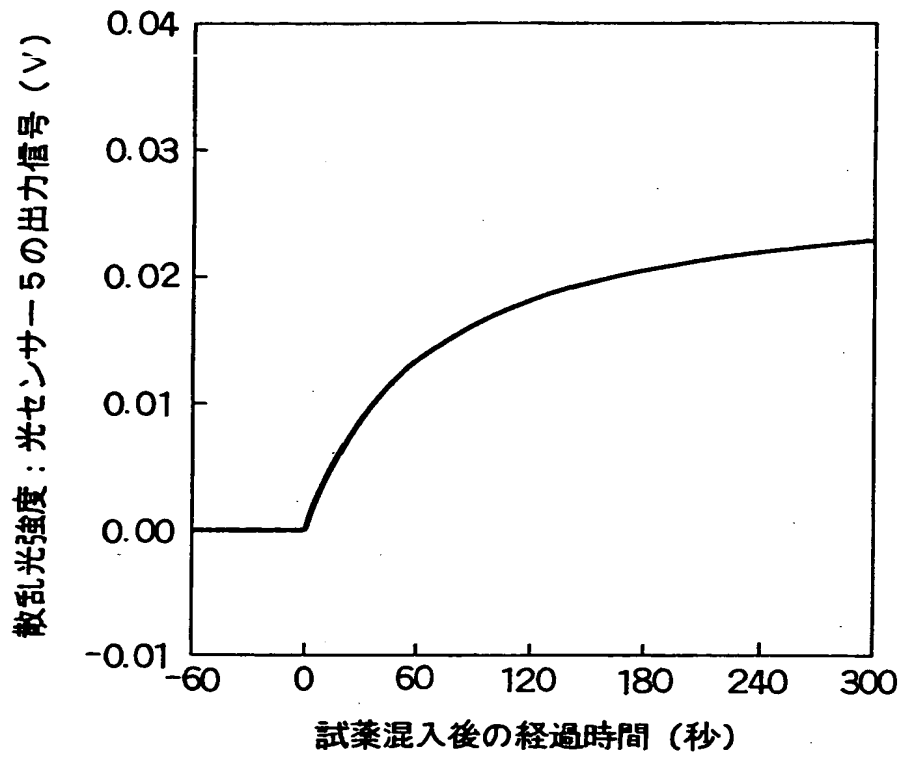
【図 5】



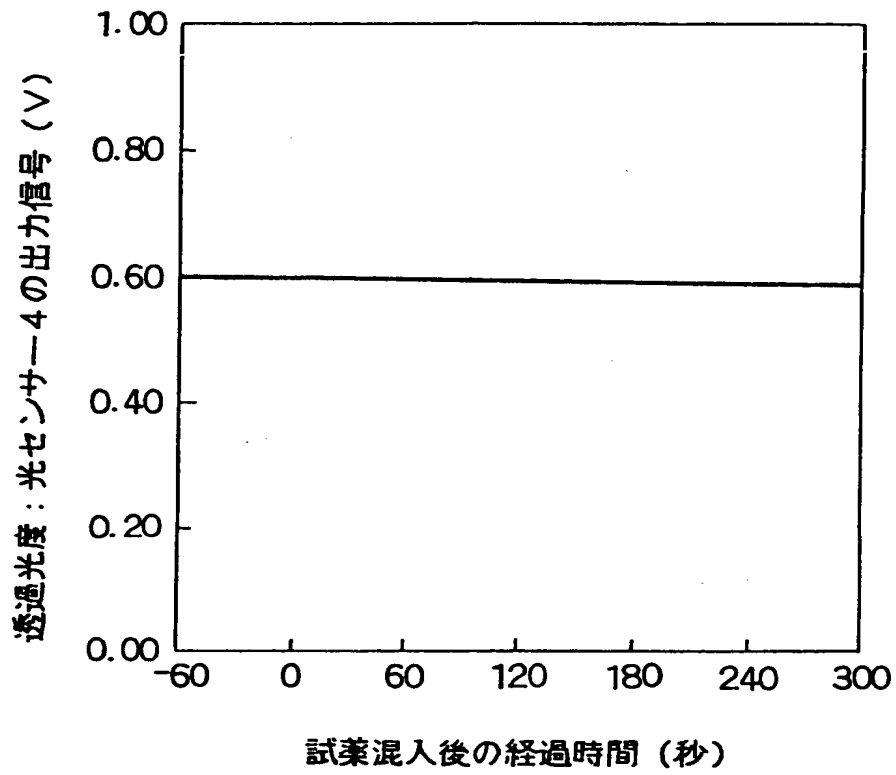
【図 6】



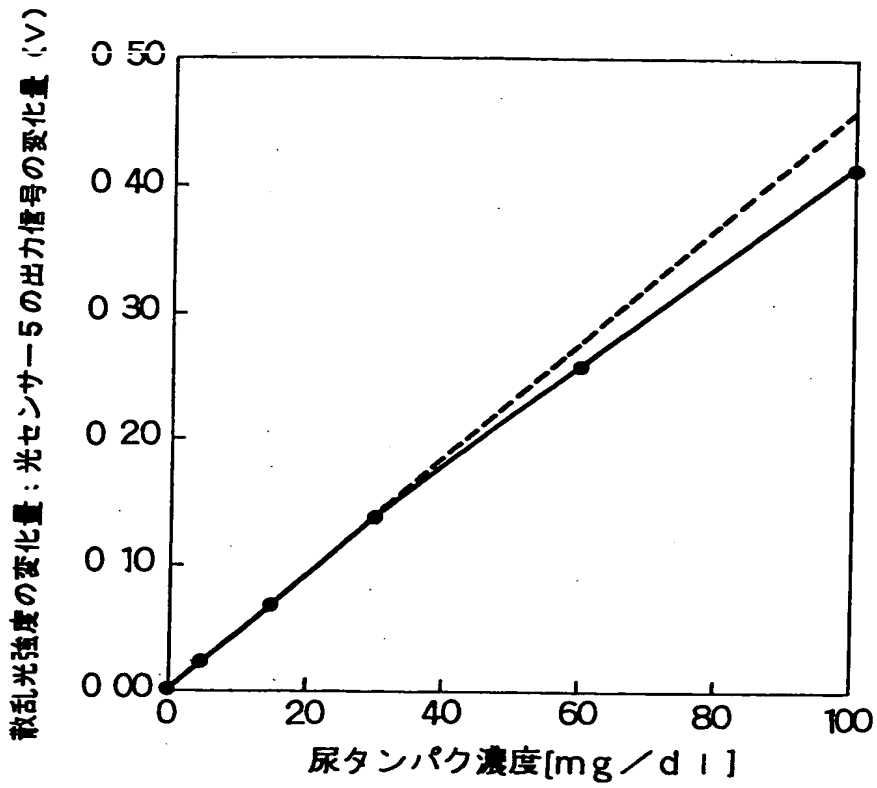
【図 7】



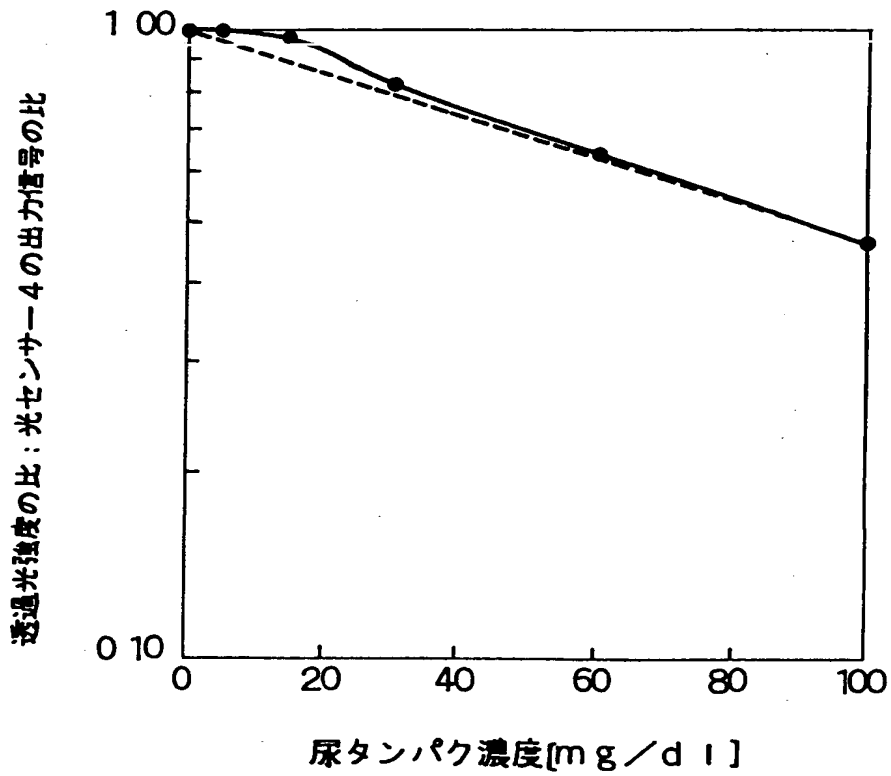
【図 8】



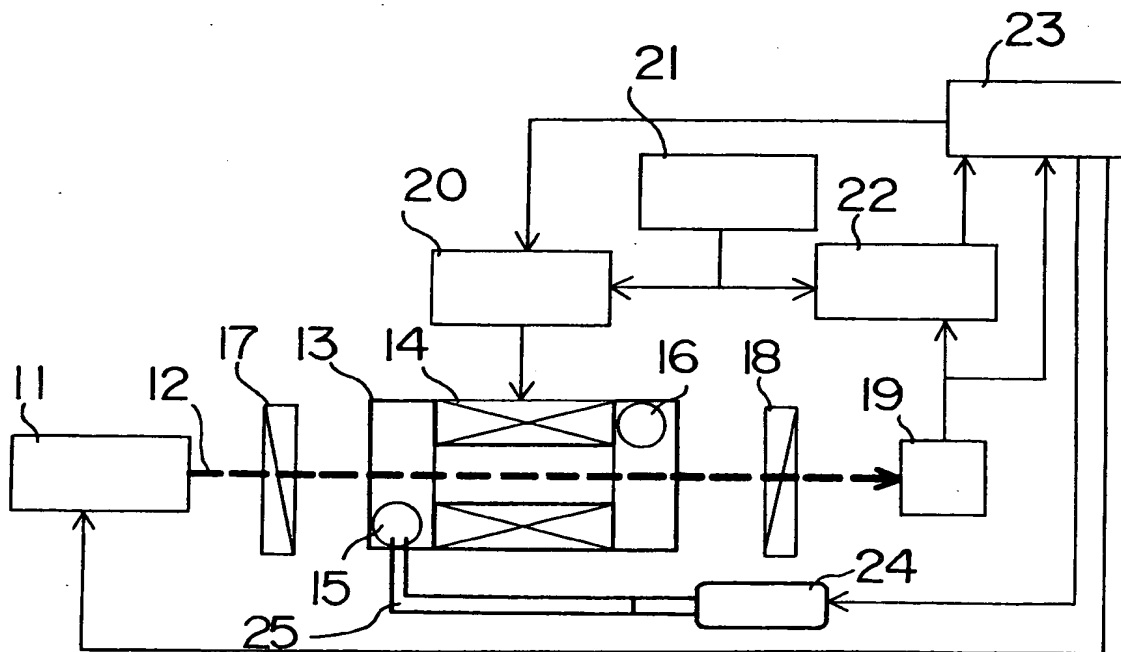
【図 9】



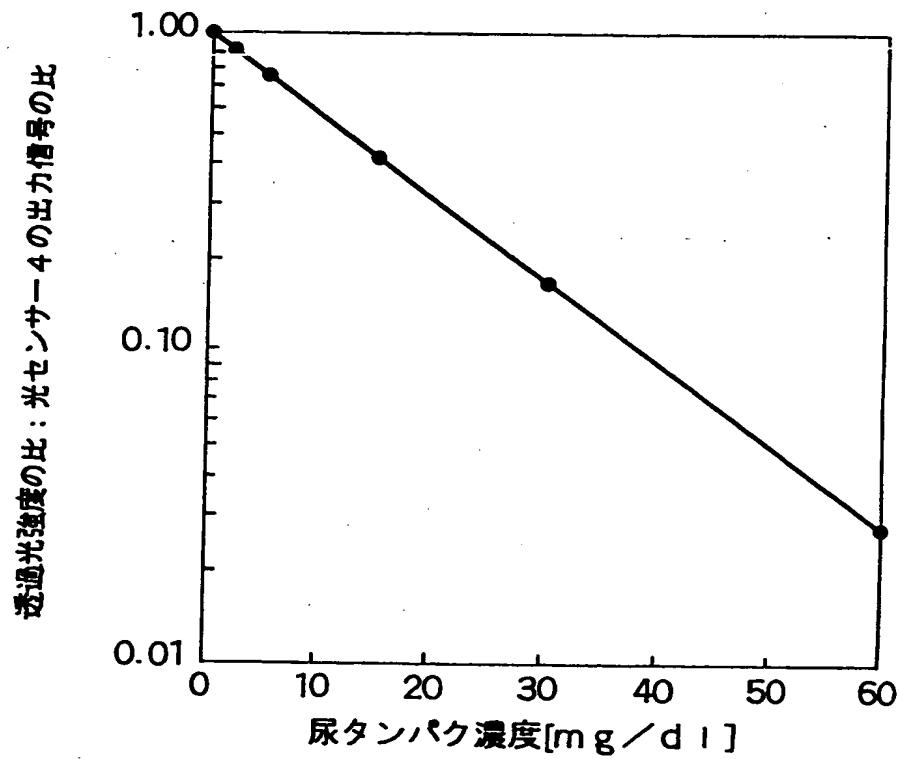
【図 10】



【図 11】



【図 1 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 家庭でありうる 25℃以上の環境温度においても、安定的にタンパク質濃度を計測することができ、さらに浮遊粒子等の妨害が防止され、計測濃度範囲の拡大されたタンパク質濃度の計測方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 試薬として、タンニン、タンニン酸、またはm-ガロイル没食子酸を使用する。この試薬を被検溶液に混入して被検溶液を混濁させ、透過光および／または散乱光強度を計測し、タンパク質濃度を計測する。また、旋光度を計測後にタンパク質濃度を計測することにより、タンパク質以外の旋光性物質の濃度を求められる。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第374752号
受付番号	59901284293
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年 1月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年12月28日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名 松下電器産業株式会社